BIOTECMAR

Biotechnological valorisation of marine products and by-products

Utilisation des cultures cellulaires pour évaluer la cytotoxicité et l'activité anti-tumorale de molécules ou d'extraits

08 Juillet 2011

Ingrid Fruitier-Arnaudin
ifruitie@univ-lr.fr

Par des tests de biologie cellulaire mesurant les effets sur la croissance de cellules tumorales ou saines

INVESTING IN OUR COMMON FUTURE

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme

Sommaire

- **Culture cellulaire : définition, utilité**

- **Le criblage biologique d'extraits : mode d'emploi**
  - Avec quels équipements ?
  - Avec quelle procédure ?
  - Avec quels échantillons ? Extraits bruts, molécules purifiées….

- **Exemple de criblage d'extraits marins**

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Culture cellulaire, définitions

Définition : Technique de labo pour faire vivre des cellules *in vitro*.

Le but est de multiplier des cellules ou de les maintenir vivantes pour les utiliser.

2 types de cultures cellulaires:

- Lignées (immortelles) ou,
- Cultures primaires à partir d'organes ou tissus

En suspension, ou en adhésion

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Culture cellulaire, définitions

Cellules en lignées:

Dont les cellules cancéreuses :

- transformées par un virus qui les rend immortelles
- à nombre de passages illimités, donnant une lignée continue
- sont les plus utilisées en culture cellulaire

Co-financed with the support
of the European Union ERDF
Atlantic Area Programme
«Investing in our commun future»

Culture cellulaire : utilité

- Faire le lien entre l'expérimentation l'animal et les essais de phase clinique
- Le but est de chercher à reproduire en culture les caractéristiques principales d'un tissu
- Utilité particulière des modèles in vitro pour le **criblage biologique d'extraits bruts ou purifiés**

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

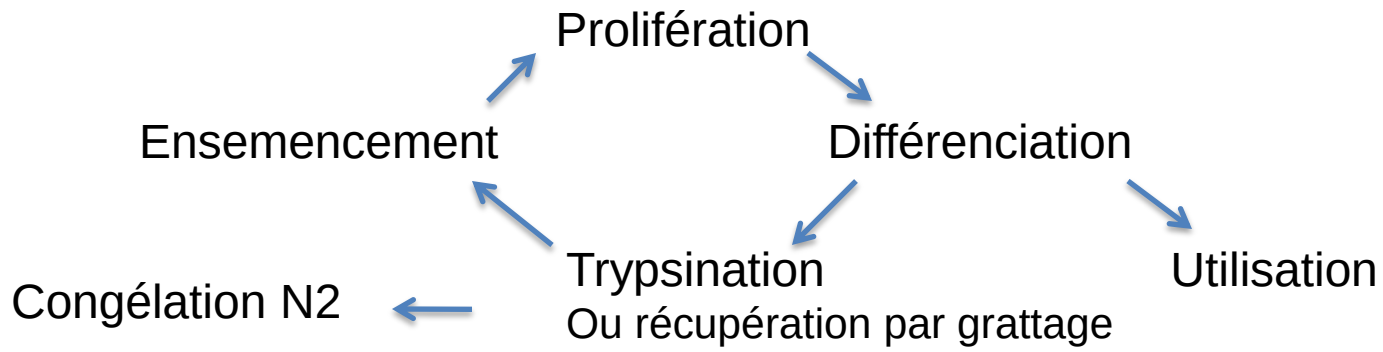
Avantages et inconvénients des lignées et des cultures primaires

Cultures I → **Prolifération** → **Différenciation** → **Utilisation**

Durée de vie de quelques semaines au maximum

Avantages : conservent assez bien les caractéristiques du tissu d'origine
Mais cell en qté limitée (peu de prolifération)

Lignées : multiples ensemencements, définition des passages



Avantages : obtention de cellules à volonté, en quantité suffisante
mais attention à la dérive

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Le criblage biologique d'extraits = mode d'emploi

Utilités : Obtenir la signature biologique d'actifs sur des modèles cellulaires simples

Identifier et caractériser des molécules bioactives

Mise en place de tests cellulaires *in vitro*

Sur des modèles cellulaires tumoraux, spécifiques d'un organe donné

1. **Evaluation des propriétés cytotoxiques des molécules/extraits**
   - Détermination des doses tolérables pour les cellules (DL10, DL50)

2. **Evaluation des effets des molécules/extraits sur la croissance cellulaire**
   - Tests de prolifération cellulaire
   - Détermination des % d'inhibition de croissance

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Avec quels équipements?

Sur une plateforme de culture cellulaire

Qui nous permet de cribler des banques de composés chimiques ou d'extraits naturels

Nous disposons d'un laboratoire de niveau L2 de confinement associé aux équipements suivants :

- Un incubateur à cellules
- 2 postes de sécurité microbiologique
- 1 autoclave
- 1 salle de préparation des milieux et de mesure des activités
- 2 robots pipeteurs-diluteurs
- Microscopes à contraste de phase
- Lecteurs de microplaque fluorescence, absorbance

Et d'une expertise dans la mise en place de divers tests biologiques utilisés dans la recherche de molécules bioactives et de tests d'interaction

Libération de facteurs solubles, survie cell, toxicité…

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Co-financed with the support
of the European Union ERDF
Atlantic Area Programme
«Investing in our commun future»

Avec quelle procédure ?

Par le choix d'un modèle cellulaire adapté aux applications

- par sa mise en culture
- Et son contact avec les extraits à tester

Cellulothèque de plusieurs lignées tumorales, cellules humaines obtenues à partir de tumeurs

Sein
- MCF7
- MCF7/AZ
- MDA-MB231

Prostate
- PC3

Glioblastome
- U87
- U251

Foie
- HuH7

Poumons
- H460
- A549

1. Evaluation des propriétés cytotoxiques des molécules ou extraits

2. Evaluation des effets des molécules ou extraits sur la croissance cellulaire

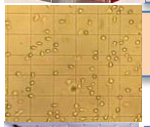
Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

1 Evaluation des propriétés cytotoxiques des molécules ou extraits

Ces tests permettent de **déterminer les doses cytotoxiques** des molécules/extraits (DL50), c'est à dire les concentrations tolérables pour les cellules.

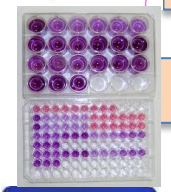
Techniques utilisées pour le criblage d'extraits ou de molécules = **SUCCESSION ETAPES**

Cellules (tumorales ou saines)

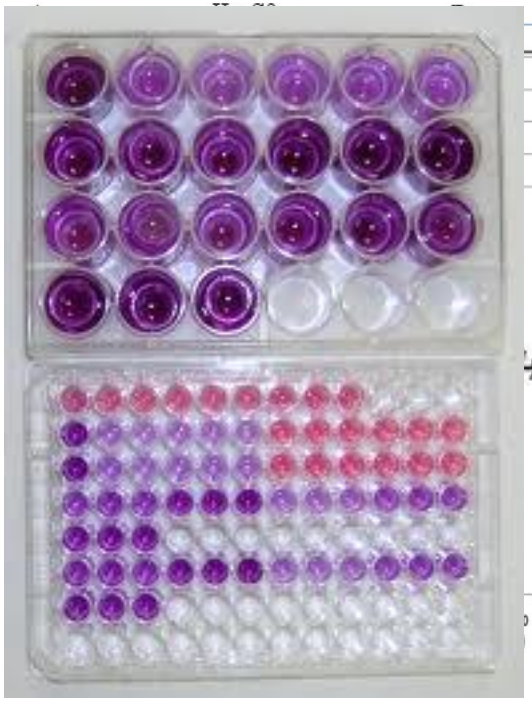

Comptage cellulaire

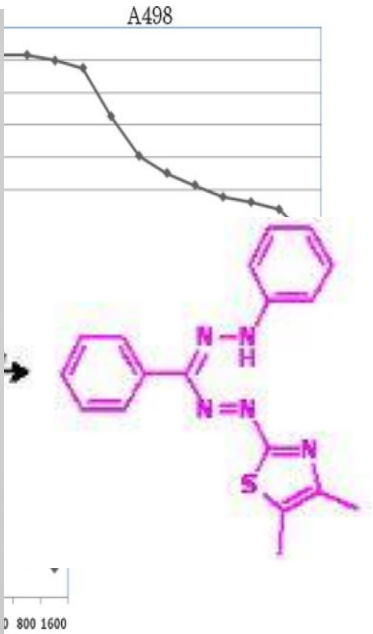
Ensemencement 96 puits
24h adhérence

Incubation des extraits
dose-dépendante - 48h
Ajout du réactif MTT


Solubilisation des cristaux

Produit bleu-violet dosable
à 540nm


Lecture absorbance lecteur microplaque



DL50 ou IC50 : µg/ml d'extrait capable de réduire de 50% la pop cellulaire

Ajout d'un sel de tétrazolium (MTT) réduit par les cellules vivantes
(deshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes)

Dans l’expérience de cytotoxicité : 13 doses pour un même extrait ont été testées sur 3 lignées différentes pour le calcul de la DL50

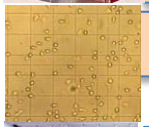
Lignée 1 Lignée 2 Lignée 3

3 mises en culture : 1 à 2 semaines pour obtenir la confluence
Décollement et ensemencement des microplaques : une ½ journée
24h d’adhérence
Incubation avec échantillons (après les avoir dilué): une ½ journée
48h pour résultat
Soit environ 3 semaines d’expériences pour obtenir les valeurs de DL50 pour un extrait

2 Evaluation des effets des molécules ou extraits sur la croissance cellulaire

Ces tests permettent de **mesurer si l**es molécules/extraits **stimulent ou inhibent** la croissance des cellules

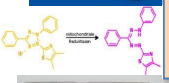
Cellules (tumorales ou saines)

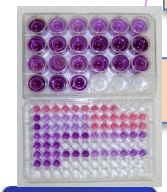


Comptage cellulaire

Ensemencement 96 puits
24h adhérence

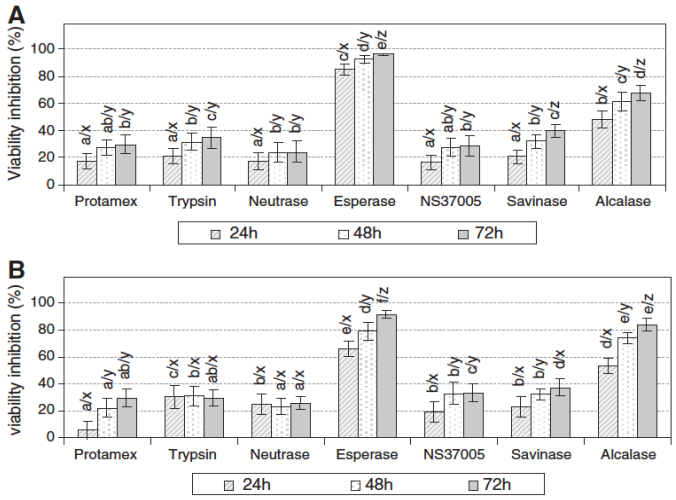
Incubation des extraits dose-dépendante – 24h48h72h
Ajout du réactif MTT





Solubilisation des cristaux

Produit bleu-violet dosable à 540nm



MCF7

U87

Fig. 3. Effect of gelatin hydrolysates on the viability of cancer cells for 24, 48 and 72 h in cell culture medium containing a concentration of 1 mg/mL of hydrolysate. MCF-7 cell line (A). U87 cell line (B). Different letters (a, b, c,...) within the same time period indicate significant differences ($p \leq 0.05$). Different letters (x, y, z) within the same hydrolysate indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

% inhibition de croissance pour un extrait donné

Quels échantillons ?

Extraits bruts d'origine marine et/ou terrestre (animale; végétale)

Hydrolysats bruts de protéines pour l'étude des peptides

Hydrolysats bruts de polysaccharides pour l'étude des oligosaccharides

Fractions enrichies en composés d'intérêt

Besoin d'avoir la carte d'identité moléculaire de l'extrait :
- Solvant d'extraction, pH
- Facteur de concentration
- Teneur en protéines, sucres, lipides, AN….

Application de techniques biochimiques de caractérisation des extraits

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Exemple d'une démarche

Food Chemistry 126 (2011) 1006–1012

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae

Felix Nwosu, Jennifer Morris, Victoria A. Lund, Derek Stewart, Heather A. Ross, Gordon J. McDougall *

Plant Products and Food Quality Programme, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Scotland, UK

Étapes chimiques

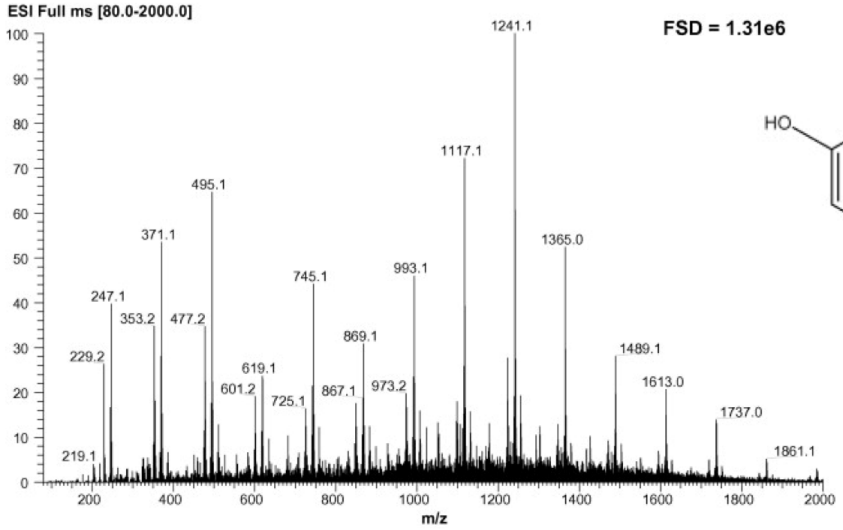
- Extraction des composés
- Qualification des échantillons
  - Contenu total en composés phénoliques
  - Caractérisation LC/MS des composés de l'extrait
  - Fractionnement par exclusion

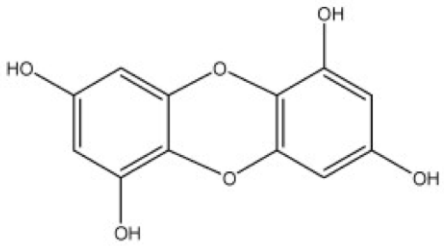
Étapes biologiques

- Tests biologiques de viabilité cellulaire
  Cellules tumorales de colon (Caco-2)
- Tests enzymatiques variés
  Amylase/lipase….

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

MS spectra of the Ascophyllum Sephadex LH-20 bound fraction





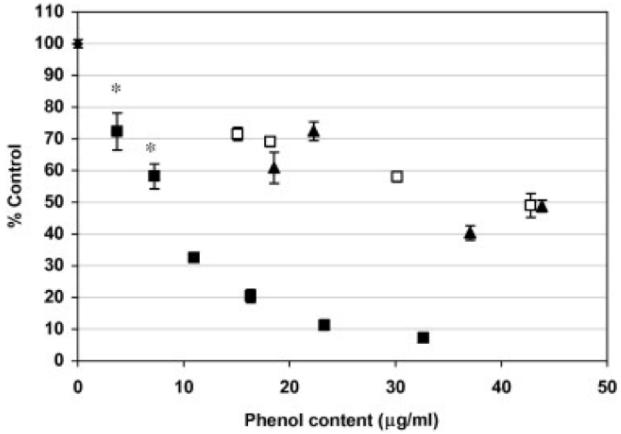


Fig. 1. Effect of seaweed extracts on proliferation of cultured colon cancer (Caco-2) cells filled squares = *Alaria*; open squares = *Ascophyllum* and closed triangles = *Palmaria* extracts. The % proliferation values are averages of values obtained from quadruplicate assays on the microtitre system, carried out on three separate days (i.e. n = 12) ± standard error (SE). Values for *Alaria* at lower concentrations (marked with asterisks) are average values from one experiment ± standard error (n = 4).

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Food Research International 44 (2011) 1044–1051

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity

A. Alemán [a], E. Pérez-Santín [a], S. Bordenave-Juchereau [b], I. Arnaudin [b], M.C. Gómez-Guillén [a,*], P. Montero [a]

[a] Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN, CSIC) (formerly Instituto del Frío), C/ José Antonio Novais, 10, 28040, Madrid, Spain
[b] Laboratoire Littoral ENvironnement et Societés (LIENSS), Université de La Rochelle, CNR UMR 6250 UFR Sciences, Avenue M. Crepeau 17042, La Rochelle, France

Hydrolysats bruts/fractionnés de gélatines marines ont été testés pour plusieurs activités biologique :

- **anti-hypertensives**
- **anti-oxydantes**
- **et anti-cancéreuses**

The Alcalase hydrolysate was the most potent angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor (IC50=0.34 mg/mL)
the Esperase hydrolysate showed the highest cytotoxic effect on cancer cells,with IC50 values of 0.13 and 0.10 mg/mL for MCF-7 (human breast carcinoma) and U87 (glioma) cell lines, respectively.

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

Grâce à notre plateforme cellulaire

BIOTECMAR

Vous pouvez :

- Obtenir la signature biologique d'actifs sur des modèles cellulaires simples
- Identifier et caractériser des molécules bioactives

Détermination des doses tolérables pour les cellules (DL10, DL50)

Détermination des % d'inhibition de croissance

A quel coût ? Sous forme de contrats de prestation, coût sera fonction du nombre et de la nature des échantillons à cribler.

Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme «Investing in our commun future»

ATLANTIC AREA Transnational Programme

European Union

European Regional Development Fund